

## 【総説】

## 「細胞運動と浸潤の分子機構」

## Molecular mechanisms for cell migration and invasion

金沢大学がん研究所細胞機能統御研究分野  
(旧ウイルス部)

滝 野 隆 久

## I. はじめに

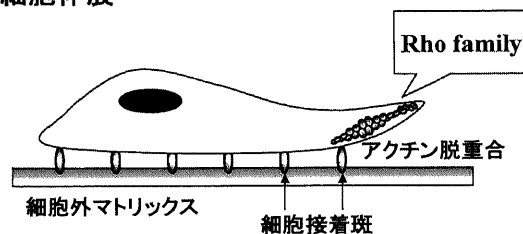
高浸潤・転移性のがん細胞は一般に高い運動能を有している。しかし、がん細胞が実際に浸潤・転移するためには周囲の細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) の分解と再編が必須である<sup>1)~3)</sup>。がん細胞はECM分解酵素、主にmatrix metalloproteinase (MMP) によりECMを分解する。がん細胞によるECM分解は単なる物理的障壁の破壊だけではなく、遺伝子発現・細胞運動誘導などの情報伝達の制御にも重要であると考えられている。細胞運動はがん細胞特異的なものではなく発生、免疫、血管新生、炎症、創傷治癒などの生体機能維持に不可欠な細胞機能である。細胞運動はECMや細胞増殖因子等の刺激で誘導されるが、その情報伝達機構は非常に複雑で不明な点が多い。細胞のECMへの接着は mitogen-activated protein kinase (MAPK), 特にextracellular signal-regulated kinase (ERK) とc-Jun N-terminal kinase (JNK), あるいはphosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), Rho family small GTPase (Rho, Rac, Cdc42) など様々な情報伝達経路の活性化を誘導し、細胞増殖、細胞分化、遺伝子発現、細胞死、細胞運動を制御している<sup>4)~6)</sup>。本稿ではECMにより誘導される細胞運動の分子機構と、多くのがん細胞に発現してがんの浸潤・転移の中心的な役割を担う膜型MMP1 (membrane-type 1 MMP, MT1-MMP) による細胞運動・浸潤誘導について簡単に紹介したい。

## II. 細胞運動誘導

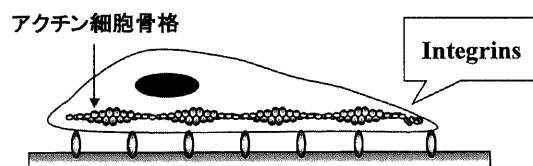
細胞がECMにそのレセプターであるインテグリンを介して接着すると、インテグリンの集積を引き金にリン酸化酵素、脱リン酸化酵素、アクチン結合分子、アダプター分子などの分子複合体である細胞接着斑 (focal adhesion) が形成される<sup>4)~6)</sup>。細胞接着斑は細胞の足となる一方で情報伝達の足場としても機能する。細胞運動は図1に示したように大きく4ステップに分けられる。1) Rhoファミリーによるアクチンおよび微小管の脱重合による細胞伸展。2) インテグリンを介した細胞とECMの接着による新しい細胞接着斑の形成。3) RhoのエフェクターであるRho kinase (ROCK) やミオシン軽鎖リン酸化酵素 (Myosin light chain kinase, MLCK) による細胞収縮と核移動。4) Rhoや微小管による細胞骨格の脱重合と細胞接着斑の離脱である。1)~4)のステップを繰り返すことによって細胞は移動する。しかし、細胞運動誘導刺激によるこの非常に複雑な情報伝達の制御機構および細胞が運動の方向 (極性) を維持する機構は十分理解されていない。細胞が足である細胞接着斑と牽引・推進力を支持する細胞骨格をコントロールして進行方向を決定し、細胞運動を維持する機序は不明である。

様々な情報伝達系の関与が指摘されているが、少なくとも細胞運動には細胞接着斑を介したECMとの接着と離脱を繰り返すことが必須となることから、細胞接着斑のターンオーバーの機序解明が鍵を握ると考えられている。

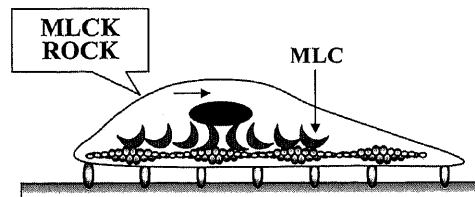
## 1) 細胞伸展



## 2) 新しい細胞接着斑の形成



## 3) 細胞の収縮



## 4) 細胞後縁の離脱

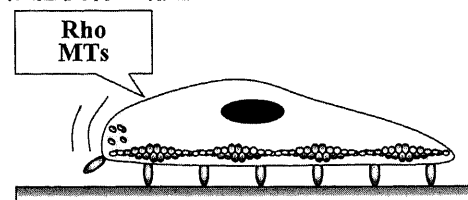


図1. 細胞運動機序

MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; MTs, microtubules; ROCK, Rho kinase

### Ⅲ. 細胞運動測定方法

細胞運動の測定法はトランスウェル・チャンバーを用いたケモタキシス測定やWound-induced migration assayが主流であった。しかし、これらの方法ではContact inhibitionや細胞間接着が問題となるため純粋な細胞運動の測定が困難であった。最近顕微鏡周辺機器の発達により、通常の培養条件下でTime lapse video microscopyを用いて一つ一つの細胞の動きを経時的

に測定する方法が主流になりつつある(図2A)。この方法の特徴は純粋な細胞の運動測定が可能であること、細胞運動の方向性(D/T ratio: D=始点と終点の直線距離, T=移動距離)や速度が解析できること、標的分子をGFP等の蛍光物質に融合することで細胞運動時の細胞内分布が「Live」で観察できることにある。また、細胞運動だけでなく細胞浸潤も観察可能である。細胞は突起を進行方向に進展させた後、細胞本体を移動する様子が観察できる(図2B)。我々もTime lapse video microscopyを用いて細胞運動・浸潤を解析している。

#### Ⅳ. インテグリンを介した細胞運動誘導シグナル

インテグリンは $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖のヘテロ2量体からなり、その組み合わせによりコラーゲン、フィブロネクチンなどの様々なECM構成成分と結合する。図3に示したように細胞のECMへの接着はインテグリンの集積を誘導し、その結果focal adhesion kinase (FAK)が集積し、分子間で自己リン酸化を行う。FAKの自己リン酸化部位(397番チロシン)にはPI-3KやSrcが結合して下流へ情報を伝達する。PI-3Kはphosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>)を産生しRhoファミリーを活性化することで細胞運動を誘導する<sup>4)-6), 14)</sup>。実際PI-3K阻害剤(WortmanninまたはLY294002)による細胞処理やPIP<sub>3</sub>脱リン酸化酵素phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) / mutated in multiple advanced cancers (MMAC)の過剰発現は細胞運動を抑制する<sup>7)-10)</sup>。SrcはFAKと結合して相互をリン酸化することで互いの酵素活性を増強する。その結果、FAKに結合しているp130 Crk associated substrate (p130<sup>Cas</sup>)やpaxillin等のアダプター分子をリン酸化することで様々な分子をFAK/Src複合体に凝集する。特に、p130<sup>Cas</sup>/Crk/DOCK180/ELMO/Rac1からJNKに至る経路は細胞運動に重要であることが知られている<sup>4)-6)</sup>。我々もp130<sup>Cas</sup>とCrkの結合が脱リン酸化酵素protein tyrosin phosphatase 1B (PTP1B)で制御されること<sup>10)</sup>、CrkIの発現がN-cadherin非依存的なPI-3K活性化を誘導し、細胞運動を誘導することを報告してきた<sup>11)</sup>。現在、細胞接着斑が情報伝達の足場(scaffold)となり細胞運動を誘導するにはFAK/Src複合体を中心とした分子複合体(FAK scaffold)の形成が不可欠であると考えられている。このFAK scaffoldの新たな構成因子としてJNK/stress-activated protein kinase-associated protein 1 (JSAP1)を我々は報告した<sup>12)</sup>。JSAP1はJNK活性化を制御するMEKK, SEK, JNKと結合するJNK経路の足場蛋白である<sup>13)</sup>。JSAP1がFAK scaffoldと協調作用することでより効率の高い選択的なJNK活性化と細胞運動が誘導されると予想される。

#### Ⅴ. 細胞骨格と細胞運動

では、単にPI-3KやJNK経路が活性化されれば細胞運動は誘導されるのであろうか? 図4Aに示したように血清飢餓状態の細胞に血清を加えるとJNK, ERK, Aktが活性化される。微小管の重合阻害剤Nocodazoleの細胞処理はJNKを活性化するが、血清刺激によるERK, Akt活性化には影響を与えない。しかし、Nocodazoleは血清刺激で誘導される極性を有した細胞接着斑(paxillin)とアクチン・ストレスファイバー形成(F-actin)を阻害することで(図4C)、血清刺激により誘導される細胞運動を顕著に抑制する(図4B)。つまり細胞運動誘導は細胞骨格系とインテグリン/FAKを介した情報伝達系のどちらかが阻害されると成立しない<sup>14)</sup>。両者の協調的な制御機構が細胞運動と極性形成に重要となる。

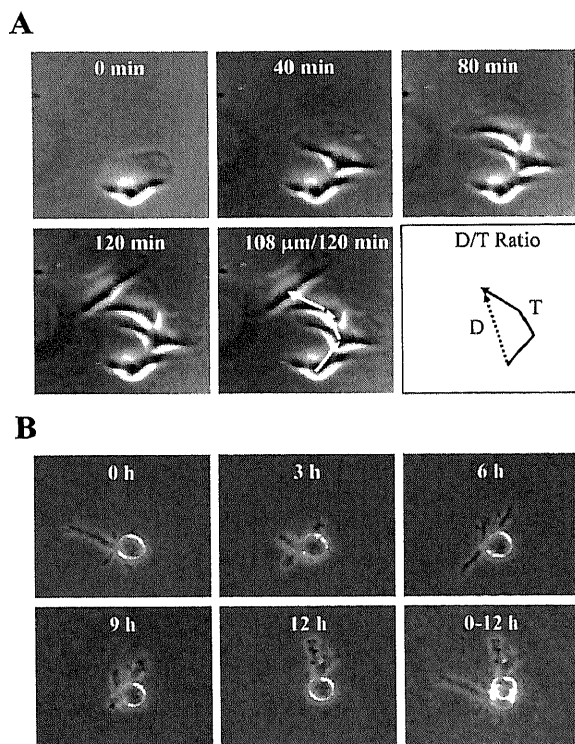


図2. Time lapse video microscopyによる細胞運動測定  
A) U87MG細胞をフィブロネクチン上に10%血清存在下で12時間接着させた後、細胞運動を120分撮影した。  
B) HT1080細胞をマトリゲル内で培養(3次元培養)し、細胞移動を12時間撮影した。

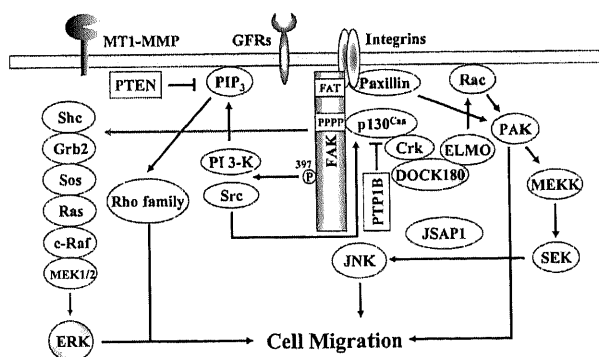


図3. インテグリン/FAKを介した細胞運動誘導機構  
GFR, growth factor receptors; FAK, focal adhesion kinase; FAT, focal adhesion targeting motif; PAK, p21-activated protein kinase; p130<sup>Cas</sup>, p130 Crk associated substrate; PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homologue; PTP1B, protein tyrosin phosphatase 1B

## VI. MT1-MMPと細胞運動

ECMや細胞増殖因子によるMAPKやPI-3K活性化は細胞運動だけではなく、遺伝子発現も制御している。特にMAPKは転写因子の活性化を誘導することでECM分解酵素MMP-1やMMP-9の発現を誘導する。MMPはその活性中心に $Zn^{2+}$ をもつ金属酵素であり、ECM構成成分であるコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどに対して分解活性を有している。これまでに23種類のMMPが哺乳類から発見されており、その構造上の特徴により分泌型MMPと膜型MMPに分類される<sup>10)</sup> (図5A)。

MT1-MMPはMMP-2の活性化因子として我々が同定した最初の膜結合型MMPであり、現在は6種類のMT-MMPが存在する<sup>11,12,15,17)</sup>。MT1-MMPはほとんどのヒトがん組織において発現しており、活性化型MMP-2とMT1-MMPの発現レベルには正の相関関係が認められる。MT1-MMPはMMP-2以外のECM分解酵素を活性化する能力を持ち、また自らも直接I・II・III型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどのECM構成成分を分解する<sup>11,12)</sup>。MT1-MMPによるECM分解は運動などの

細胞機能調節に深く関与することが最近明らかとなった<sup>11,12)</sup>。MT1-MMPの活性発現は3次元コラーゲンゲル培養、*v-src*などのオンコジーンによる細胞の形質転換、活性化型MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) 発現で誘導される<sup>18)~20)</sup>。一方で、MT1-MMP発現がERK活性化を誘導することも知られていた。我々はHT1080細胞がI型コラーゲン上を遊走する際にMT1-MMP酵素活性を阻害するとERK活性化、細胞接着斑のターンオーバー、細胞運動が抑制されることを見出した (図5B)。細胞のI型コラーゲンへの接着はMT1-MMPを介してERK活性化を誘導し、ERK活性化が細胞運動およびMT1-MMP活性発現を誘導するという正のフィードバック機構の存在を明らかにした<sup>21)</sup>。MT1-MMPによるECM変化は恐らく細胞接着斑の形成に影響を与えることでインテグリンを介した情報伝達経路を操作していると推測される。

## VII. 情報制御因子MT1-MMP

ECMは自身がインテグリンを介して細胞に情報を伝達する機能に加えて、種々の細胞増殖因子とその結合分子やECM分

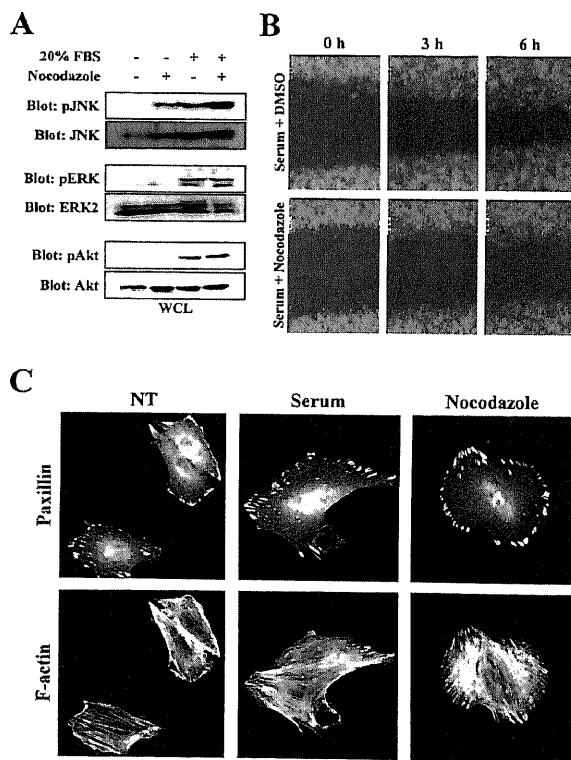


図4. 細胞運動誘導シグナルと細胞骨格

A) 血清飢餓状態にしたU87MG細胞に血清を20%, Nocodazoleを10  $\mu$ Mになるように添加した。30分後に細胞を溶解し、抗リン酸化JNK (pJNK), 抗JNK, 抗リン酸化ERK (pERK), 抗ERK, 抗リン酸化Akt (pAkt), 抗Akt抗体を用いたウェスタン・ブロッティングにて解析した。

B) U87MG細胞をフィブロネクチン上に0.5%血清存在下で3時間接着させた後、傷を付け、洗浄後に10%血清存在下で6時間細胞を観察した。

C) U251細胞をフィブロネクチン上に0.5%血清存在下で12時間接着させた後、細胞を血清+DMSO (Serum) または血清+Nocodazole (Nocodazole) で2時間処理した。未処理 (NT) の細胞とともに細胞接着斑を抗paxillin抗体 (Paxillin) で、細胞骨格をrhodamine-phalloidin (F-actin) で蛍光抗体法にて観察した。

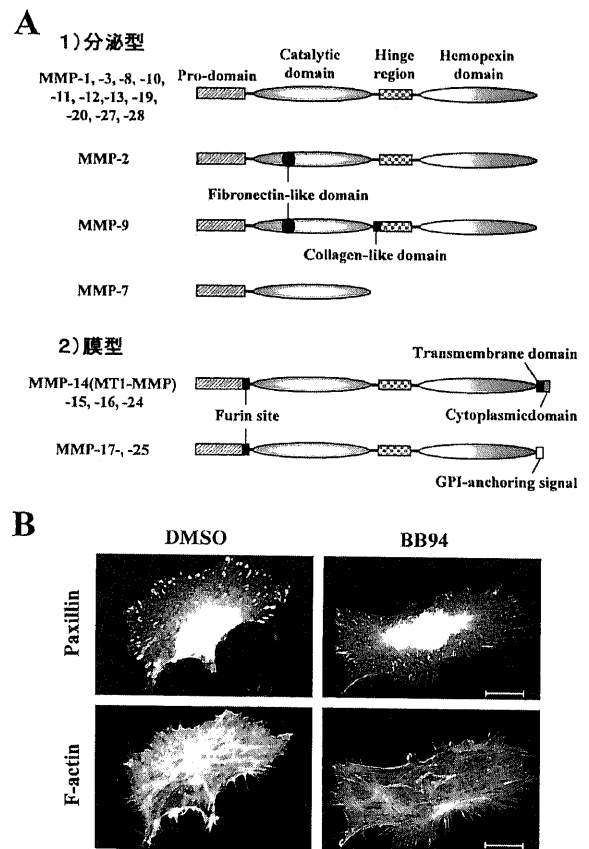


図5. MMPと細胞運動

A) MMPファミリーの構造。分泌型MMPはPro, Catalytic, Hinge, Hemopexin domainで構成され、膜型MMPはさらに膜貫通 (Transmembrane) と細胞内 (Cytoplasmic) domainをC-末端に持つ。

B) HT1080細胞をI型コラーゲン上にDMSOあるいはMMP阻害剤BB94存在下で6時間接着させ、細胞接着斑を抗paxillin抗体 (Paxillin) で、細胞骨格をrhodamine-phalloidin (F-actin) で蛍光抗体法にて観察した。Bar, 20  $\mu$ m。

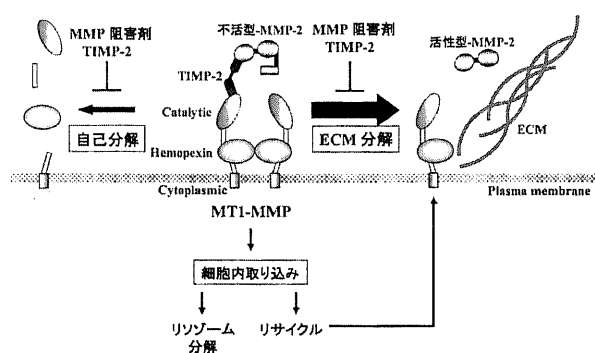


図6. 細胞表面でのMT1-MMP活性発現

解酵素阻害物質等と結合する機能も持っている。従ってがん細胞によるECM破壊はECMからの情報伝達の変化と種々の因子の放出により劇的に微小環境を変化させると考えられる。実際に腫瘍細胞が3次元コラーゲンゲル中で浸潤性増殖するためにはMT1-MMPによるコラーゲン切断が必要であることが証明された<sup>23)</sup>。つまりMT1-MMPは単なるECM分解酵素ではなく、がん細胞の浸潤性増殖のための微小環境整備に重要な情報制御因子であると考えられる。図6に示したように細胞表面でのMT1-MMPは組織MMP阻害物質 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-2との結合、MMP-2活性化、ECM分解、自己分解のいずれかの状況にあると予想される。興味深いことに多くの細胞表面の受容体と同様にMT1-MMPも細胞内ドメイン依存的に細胞内取り込み (internalization) されることが判明した<sup>23)(24)</sup>。取り込まれたMT1-MMPはリソソームで分解されるか<sup>25)</sup>、細胞表面へリサイクルされる<sup>26)</sup>。細胞内に取り込まれたMT1-MMPの動態も細胞運動・浸潤の成立に関与している可能性が十分考えられる。

#### VIII. まとめ

ECMや細胞増殖因子刺激は各々の受容体を経てFAKに集積され、細胞接着斑構成分子とRhoファミリーによりシグナルが調整される。その結果、細胞骨格の制御をとらえたERK, PI-3K, JNKなどの活性化が誘導されて細胞は動く。FAK scaffoldによる細胞運動時の細胞骨格と情報伝達系の制御機構の解明を目指して研究を進めていきたい。また、MT1-MMPはインテグリンの $\alpha$ v鎖、ヒアルロン酸受容体CD44, tissue transglutaminase, syndecan-1など種々の膜蛋白のプロセッシングにも関与している<sup>27)-(31)</sup>。細胞表面でのMT1-MMPによる膜蛋白の活性化・不活化も細胞運動・浸潤の制御に密接に関与していると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 14: 624-32, 2002
- 2) Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 96: 212-217, 2005
- 3) Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91: 439-442, 1997
- 4) Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane cross-talk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805, 2001
- 5) Larsen M, Tremblay ML, Yamada KM. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 700-11, 2003
- 6) Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 118-132, 2004
- 7) Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 59: 442-449, 1999
- 8) Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 274: 20693-20703, 1999
- 9) Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 146: 389-403, 1999
- 10) Takino T, Tamura M, Miyamori H, Araki M, Matsumoto K, Sato H, Yamada KM. Tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein modulates cell migration. *J Cell Sci* 116: 3145-3155, 2003
- 11) Takino T, Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Yamada KM, Sato H. Crkl adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Res* 63: 2335-2337, 2003
- 12) Takino T, Yoshioka K, Miyamori H, Yamada KM, Sato H. A scaffold protein in the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway is associated with focal adhesion kinase and tyrosine-phosphorylated. *Oncogene* 21: 6488-6497, 2002
- 13) Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, Hibi M, Nakabeppu Y, Shiba T, Yamamoto KI. JSAP1, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 19: 7539-7548, 1999
- 14) Wittmann T, Waterman-Storer CM. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* 114: 3795-3803, 2001
- 15) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65, 1994
- 16) Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M. Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene* 155: 293-298, 1995
- 17) Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. *J Biol Chem* 270: 23013-23020, 1995
- 18) Kadono Y, Shibahara K, Namiki M, Watanabe Y, Seiki M, Sato H. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in

the formation of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching tubules in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 681-687, 1998.

19) Kadono Y, Okada Y, Namiki M, Seiki M, Sato H. Transformation of epithelial Madin-Darby canine kidney cells with p60 (v-src) induces expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Res* 58: 2240-2244, 1998

20) Kurata H, Thant AA, Matsuo S, Senga T, Okazaki K, Hotta N, Hamaguchi M. Constitutive activation of MAP kinase kinase (MEK1) is critical and sufficient for the activation of MMP-2. *Exp Cell Res* 254: 180-188, 2000

21) Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M, Sato H. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase activation and cell migration. *Cancer Res* 64: 1044-1049, 2004

22) Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114: 33-45, 2003

23) Uekita T, Itoh Y, Yana I, Ohno H, Seiki M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol* 155: 1345-1356, 2001

24) Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13693-13698, 2001

25) Takino T, Miyamori H, Kawaguchi N, Uekita T, Seiki M, Sato H. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 160-166, 2003

26) Remacle A, Murphy G, Roghi C. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci* 116: 3905-3916, 2003

27) Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, Baci PG, Zhang H, DiScipio RG, Chestukhina GG, Smith JW, Deryugina EI, Strongin AY. An alternative processing of integrin  $\alpha v$  subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 277: 7377-7385, 2002

28) Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153: 893-904, 2001

29) Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, Tojo H, Yana I, Seiki M. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J* 21: 3949-3959, 2002

30) Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* 276: 18415-18422, 2001

31) Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*, 278: 40764-40770, 2003